

研究报告

鼠李糖乳杆菌碱性磷酸酶的提取条件优化及其降解有机磷农药作用

塔娜¹, 段晓霞², 何宇星¹, 刘玮¹, 梁程媛¹, 张恩馨¹, 乌云达来^{*1}

1 内蒙古农业大学食品科学与工程学院, 内蒙古 呼和浩特 010018

2 内蒙古蒙牛乳业(集团)股份有限公司, 内蒙古 呼和浩特 011500

塔娜, 段晓霞, 何宇星, 刘玮, 梁程媛, 张恩馨, 乌云达来. 鼠李糖乳杆菌碱性磷酸酶的提取条件优化及其降解有机磷农药作用[J]. 微生物学通报, 2022, 49(9): 3671-3681

Tana, Duan Xiaoxia, He Yuxing, Liu Wei, Liang Chengyuan, Zhang Enxin, Wuyundalai. Optimization of the extraction of alkaline phosphatase from *Lactobacillus rhamnosus* and the mechanism underlying the degradation of organophosphorus pesticides[J]. Microbiology China, 2022, 49(9): 3671-3681

摘要:【背景】我国作为农业大国,对农药的大量使用是不可避免的,但是农药的超范围使用、超标及高检出率对于环境的污染与人体健康的威胁日趋严重。【目的】碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)对有机磷农药具有积极的降解作用,因此,本文对鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*) Z23 (LGG Z23)所产碱性磷酸酶的提取条件进行优化,并研究其对有机磷农药的降解作用。【方法】使用单因素试验和正交试验优化 ALP 的提取条件;使用对硝基苯酚法测定酶活力;使用分级沉淀和层析法提纯 ALP;使用乙酰胆碱酯酶抑制法测定 ALP 对有机磷农药的降解率。【结果】LGG Z23 所产 ALP 的最优提取条件为:细胞破碎时间 15 min,破碎功率 450 W,料液比(质量体积比) 1:6,提取液 pH 10.0,此条件下酶活力为(4.95±0.26) U/mL,比优化前提高 2.11 倍;对 6 种有机磷农药的降解率效果为敌敌畏(95.79%±0.01%)>甲基对硫磷(90.69%±0.03%)>毒死蜱(88.90%±0.02%)>敌百虫(86.07%±0.03%)>马拉硫磷(85.31%±0.02%)>乐果(83.18%±0.03%),其中对敌敌畏和甲基对硫磷的降解效果最好,可达 90%以上,并且降解作用差异显著($P<0.05$)。【结论】本研究为 LGG Z23 所产 ALP 的应用研究提供了理论依据和实验数据。

关键词: 鼠李糖乳杆菌; 碱性磷酸酶; 提取条件; 有机磷农药; 降解率

基金项目: 内蒙古自治区科技计划重大专项(2020CG0012); 内蒙古自治区高等学校科学研究项目(NJZY19054); 内蒙古农业大学教育教学改革研究重点项目(JGZD201813)

Supported by: Transformation Program of Scientific and Technological Achievements of Inner Mongolia Autonomous Region (2020CG0012); Scientific Research Project of Colleges and Universities in Inner Mongolia Autonomous Region (NJZY19054); Major Project of Education and Teaching Reform of Inner Mongolia Agricultural University (JGZD201813)

*Corresponding author: E-mail: wydl@imau.edu.cn

Received: 2022-01-19; Accepted: 2022-04-05; Published online: 2022-04-25

Optimization of the extraction of alkaline phosphatase from *Lactobacillus rhamnosus* and the mechanism underlying the degradation of organophosphorus pesticides

Tana¹, DUAN Xiaoxia², HE Yuxing¹, LIU Wei¹, LIANG Chengyuan¹, ZHANG Enxin¹, Wuyundalai^{*1}

1 College of Food Science and Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, Inner Mongolia, China

2 Inner Mongolia Mengniu Dairy Industry (Group) Limited Company, Hohhot 011500, Inner Mongolia, China

Abstract: [Background] China, one of the world's largest agricultural economy, has seen the large-scale use of pesticides. However, the overuse of pesticides, which has led to high detection rate, has threatened the environment and human health. [Objective] Alkaline phosphatase (ALP) can degrade organophosphorus pesticides. Therefore, we optimized the extraction of ALP from *Lactobacillus rhamnosus* Z23 (LGG Z23) and explored the mechanism underlying the degradation of organophosphorus pesticides. [Methods] Single factor test and orthogonal test were used to optimize the extraction. The enzyme activity was determined by detecting the amount of *p*-nitrophenol released. Fractional precipitation and chromatography were employed for the purification of ALP. The degradation rate of organophosphorus pesticides was determined based on the inhibition of acetylcholinesterase. [Results] The optimum conditions for extracting ALP from LGG Z23 were as follows: disruption of cells for 15 min at 450 W, material-liquid ratio (mass to volume ratio) of 1:6, and pH 10.0. Under the conditions, the activity of ALP was (4.95±0.26) U/mL, 2.11 times higher than that before optimization. The degradation rate of 6 organophosphorus pesticides was in the order of DDVP (95.79%±0.01%)>methyl parathion (90.69%±0.03%)>chlorpyrifos (88.90%±0.02%)>trichlorfon (86.07%±0.03%)>malathion (85.31%±0.02%)>dimethoate (83.18%±0.03%). Among them, the activity of degrading DDVP and methyl parathion was the highest (over 90%), and the difference was significant ($P<0.05$). [Conclusion] The result lays a theoretical basis and provides data for the application of ALP from LGG Z23.

Keywords: *Lactobacillus rhamnosus*; alkaline phosphatase; extraction conditions; organophosphorus pesticides; degradation rate

目前,有机磷农药是我国常用的农药,由于其毒性大^[1]、药效高^[2]且易于分解等特点,是我国大量使用的主要杀虫剂种类^[3-4]。据全球有机磷农药市场估计,有机磷农药的使用量还在持续增长,2018-2023年间的年增长率将达到5.5%^[5]。除此之外,有机磷农药还能够随着环境和食物链在人体中富集^[6],对人体健康存在潜在

威胁^[7]。据报道,根据全球约8.6亿农业人口计算,每年约有44%的农民发生农药中毒,在不同中毒类型中有机磷农药中毒的发生率最高,严重威胁人民生命安全^[8]。因此,降低农作物中的农药残留至关重要。有机磷农药降解技术是解决其农药污染的主要途径^[9],包括化学降解、物理降解和生物降解等^[10]。传统的化学降解和物理

降解效果较好,但其明显的弊端就是需要投入较高成本,而且使用不当很容易产生二次污染^[11]。微生物降解是目前解决农药残留最有效的方法之一^[12],因其种类和降解机制不同,对农药的降解功效也不同^[13]。目前已知的可降解有机磷农药的微生物包括假单胞菌属(*Pseudomonas*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、节杆菌属(*Arthrobacter*)等属的细菌和木霉属(*Trichoderma*)、青霉属(*Penicillium*)等属的真菌^[14]。在微生物的降解作用下有机磷农药最终会降解为水、二氧化碳等低环境负担物质^[15],不仅成本低,而且对环境也不会产生或极少产生二次污染^[16]。

碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)是有机磷农药降解酶之一^[17],是一类在碱性条件下具有最佳活性的非特异性磷酸单酯酶^[18]。此外,降解酶可直接作用于有机磷农药^[19],提高其降解效率。在食品应用方面,许多国家将评估碱性磷酸酶的活性作为快速验证牛奶巴氏杀菌过程的标准方法,用于判定牛奶的巴氏杀菌情况;临床应用研究表明,血清 ALP 在宫颈鳞癌人群中具有一定的诊断及预测作用^[20]。此外,肠碱性磷酸酶(intestinal alkaline phosphatase, IAP)还可维持肠黏膜完整性,并可改善肠道功能^[21],因此 ALP 具有广阔的应用前景。产碱性磷酸酶的生物主要有动物、植物和微生物。因生长快、周期短、种群具有多样性等优点,用微生物生产碱性磷酸酶越来越受到人们的关注^[22-23]。早在 20 世纪 50 年代,国外就有过对产 ALP 的微生物的报道,其中关于大肠杆菌 ALP 的结构、功能及催化特性研究得最清楚^[24-25]。然而国内对微生物产 ALP 的研究较缺乏,大多集中于哺乳动物、贝类及鱼类等^[26],对乳酸菌产 ALP 的研究国内目前尚无报道。因此,本研究对自行分离筛选的 LGG Z23 所产碱性磷酸酶的提取条件进行

优化,并对有机磷农药的降解作用进行研究,以期 LGG Z23 所产 ALP 的应用研究提供实验数据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

LGG Z23 为一株产碱性磷酸酶鼠李糖乳杆菌,由本实验室自行分离保存,该菌株在 GenBank 数据库中的 16S rRNA 基因登录号为 MN582955^[27]。

敌敌畏(纯度 99.5%)、敌百虫(纯度 99.2%)、毒死蜱(纯度 98.7%)、马拉硫磷(纯度 98.1%)、甲基对硫磷(纯度 98.6%)、乐果(纯度 98.7%)等有机磷农药标准品,北京坛墨质检科技有限公司。

MRS 液体培养基:蛋白胨 10.0 g,牛肉膏 10.0 g,乙酸钠 5.0 g,酵母提取粉 5.0 g,葡萄糖 20.0 g,磷酸氢二钠 2.0 g,柠檬酸二铵 2.0 g,七水合硫酸镁 0.58 g,四水合硫酸锰 0.25 g,吐温-80 1 mL,将其全部用蒸馏水溶解后定容至 1 L,调 pH 值至 6.5, 1.0×10^5 Pa 灭菌 20 min。

脱脂乳培养基:在 100 g/L 脱脂乳水溶液中加入 1 g/L 酵母提取粉, 0.7×10^5 Pa 高压灭菌 7 min。

10 mmol/L 的 pH 10.5 碳酸缓冲溶液:分别配制 0.1 mol/L 的碳酸钠(Na_2CO_3)溶液和碳酸氢钠(NaHCO_3)溶液,再将两种溶液以 9:1 的体积比混合稀释,即为 10 mmol/L、pH 10.5 的碳酸缓冲溶液。

电热恒温培养箱,上海一恒科技有限公司;高速冷冻离心机, Eppendorf 公司;超声波细胞破碎仪, Misonix 公司。

1.2 菌种活化

将 LGG Z23 用脱脂乳培养基活化一代^[28],然后接种于 MRS 液体培养基,37 °C 静置培养 12 h;重复传代培养 2 次,完成菌种活化^[29]。

1.3 菌株 Z23 菌泥的制备

将已活化的菌株 Z23 接种于 MRS 液体培养基, 37 °C 静置培养 36 h^[30]。培养完成后将菌株发酵液于 8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 将收集到的菌体使用无菌 PBS 缓冲液洗涤后 8 000 r/min 离心 10 min, 重复 2 次, 将洗涤离心后的菌体用于碱性磷酸酶的提取。

1.4 碱性磷酸酶提取条件的优化

1.4.1 破碎时间的影响

将洗涤离心后的菌体沉淀, 用 pH 值为 10.5 的碳酸缓冲溶液按 1:10 的质量体积比制成菌悬液, 在冰浴条件下用超声波细胞破碎仪分别破碎 5、10、15、20、25、30 min, 功率 300 W, 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min 后取上清液, 用对硝基苯酚法测定酶活力^[31]。

1.4.2 破碎功率的影响

将洗涤离心后的菌体沉淀, 用 pH 值为 10.5 的碳酸缓冲溶液按 1:10 的质量体积比制成菌悬液, 在冰浴条件下, 以 100、200、300、400、500 W 的功率破碎 15 min, 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min 后取上清液, 酶活力测定方法同 1.4.1。

1.4.3 料液比的影响

将洗涤离心后的菌体沉淀, 用 pH 值为 10.5 的碳酸缓冲溶液按 1:4、1:6、1:8、1:10、1:12、1:14 的质量体积比制成菌悬液, 在冰浴条件下, 以 300 W 的功率用超声波细胞破碎仪破碎 15 min, 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min 后取上

清液, 酶活力测定方法同 1.4.1。

1.4.4 提取液初始 pH 的影响

将洗涤离心后的菌体沉淀, 按 1:10 的质量体积比制成菌悬液, 缓冲溶液 pH 值分别为 6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0, 在冰浴条件下, 以 300 W 的功率破碎 15 min, 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min 后取上清液, 酶活力测定方法同 1.4.1。

1.4.5 提取条件的正交试验

以单因素试验结果为基础, 以破碎时间、破碎功率、料液比、提取液 pH 值 4 个影响因素进行正交试验(表 1), 确定最优 ALP 提取条件组合。

1.5 ALP 的纯化

经硫酸铵分级沉淀、DEAE-52 离子交换层析、Sephadex G-200 凝胶过滤层析等步骤纯化^[27]后, 最终得到 LGG Z23 所产 ALP 纯化产物比活力为 180.27 U/mg, 纯化倍数为 48.37, 酶活回收率为 17.05%。

1.6 乙酰胆碱酯酶抑制率曲线的建立

在试管中加入 450 μL 不同浓度(0.078、0.156、0.316、0.625、1.25、2.5、5、10 μg/mL)的有机磷农药稀释液, 对照管加入 50 mmol/L pH 7.5 的磷酸缓冲液、25 μL 220 U/g 的乙酰胆碱酯酶、25 μL 75 mmol/L 的碘化硫代乙酰胆碱, 混匀后在 37 °C 水浴 20 min, 加入 50 μL 40 g/mL 的十二烷基硫酸钠(SDS)和 50 μL 10 mmol/L 的二硫代二硝基苯甲酸(DTNB)显色并终止反应, 混匀后于 412 nm 处测定吸光值^[32], 以吸光度来

表 1 ALP 提取条件正交设计及因素水平

Table 1 Orthogonal design of ALP extraction conditions and factor levels

Level	A: Crushing time (min)	B: Crushing power (W)	C: Material-liquid ratio (mass to volume ratio)	D: pH of extract
1	10	350	1:4	9.5
2	15	400	1:6	10.0
3	20	450	1:8	10.5

反映乙酰胆碱酯酶的抑制率, 吸光度大小与抑制率成正比。以有机磷农药浓度的对数值为横坐标、以相应的抑制率为纵坐标作标准曲线^[33]。

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{U_0 - U_1}{U_0} \times 100 \quad (1)$$

式(1)中, U_0 : 未受抑制的酶活性(U/mL); U_1 : 受有机磷农药抑制后的酶活性(U/mL)。

1.7 ALP 对有机磷农药降解率的测定

有机磷农药可以抑制乙酰胆碱酯酶活性, 根据 1.6 中的乙酰胆碱酯酶抑制率与有机磷农药浓度对数值标准曲线, 查找与抑制率对应的农药浓度对数值, 计算出不同培养时间碱性磷酸酶降解产物中有机磷农药的残留量^[34]。将纯化后比活力为 180.27 U/mg 的 ALP 添加至不同浓度(2、2.5、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的 6 种有机磷农药(敌敌畏、敌百虫、毒死蜱、马拉硫磷、甲基对硫磷、乐果)缓冲液中至终浓度为 1.0 mg/mL, 对照组加入等量的磷酸盐缓冲溶液, 混匀后在 37 $^{\circ}\text{C}$ 分别静置培养 2、4、6、8 h, 分析不同培养时间有机磷农药的残留量^[35]。

$$\text{ALP 对有机磷农药降解率}(\%) = \frac{C_0 - C_1}{C_0} \times 100 \quad (2)$$

式(2)中, C_0 : 降解前标准农药的浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$); C_1 : 降解反应结束后农药的浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$)。

1.8 数据处理及分析

每组实验重复 3 次, 数值用平均值 \pm SD 表示, 用 SPSS 23.0 进行实验数据统计分析, Origin 8.5 作图。

2 结果与分析

2.1 破碎时间对 ALP 提取的影响

在破碎时间 5–15 min, LGG Z23 所产 ALP 酶活力显著上升($P < 0.05$), 当破碎时间为 15 min 时酶活力最高[(2.65 \pm 0.05) U/mL]; 随着破碎时间的延长, 酶活力显著下降(图 1)。因此, LGG Z23 细胞的破碎时间确定为 15 min。

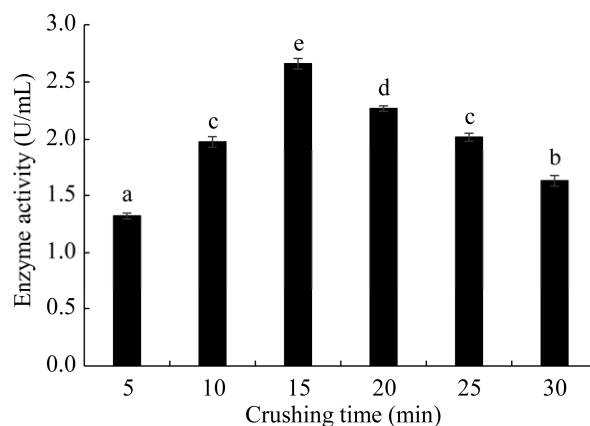


图 1 不同破碎时间对碱性磷酸酶酶活力的影响
不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。下同

Figure 1 Effect of different crushing times on the enzyme activity of alkaline phosphatase. Different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$). The same below.

2.2 破碎功率对 ALP 提取的影响

在破碎功率 100–400 W 范围内, LGG Z23 所产 ALP 酶活力显著上升($P < 0.05$), 当破碎功率为 400 W 时酶活力最高[(2.53 \pm 0.06) U/mL], 当破碎功率 500 W 时酶活力显著下降至(2.15 \pm 0.06) U/mL (图 2), 因此 LGG Z23 细胞的破碎功率确定为 400 W。

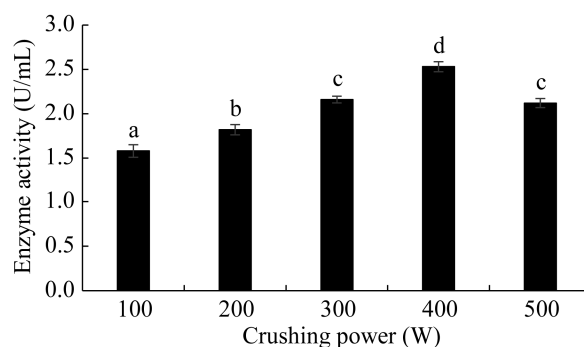


图 2 不同破碎功率对碱性磷酸酶酶活力的影响
Figure 2 Effect of different crushing power on the enzyme activity of alkaline phosphatase.

2.3 料液比对 ALP 提取的影响

从图 3 可知,在料液比为 1:4 和 1:6 (质量体积比)时, LGG Z23 所产 ALP 酶活力显著增加 ($P<0.05$); 当料液比为 1:6 时酶活力最高 [(2.85±0.04) U/mL], 当料液比小于 1:6 时酶活力显著下降, 因此料液比确定为 1:6。

2.4 提取液 pH 对 ALP 提取的影响

从不同 pH 值对 ALP 提取的影响(图 4)可知, 在 pH 6.0–10.0 范围内, LGG Z23 所产 ALP 酶活力显著增加 ($P<0.05$); 当 pH 值为 10.0 时酶活力最高 [(2.69±0.02) U/mL]; 当 pH 值为 11.0 时酶活力显著下降至 (2.42±0.02) U/mL, 因此提取液 pH 值确定为 10.0。

2.5 ALP 提取条件的正交试验

菌株 Z23 所产 ALP 最优提取条件正交试验结果(表 2)表明, 4 种因素对 LGG Z23 所产 ALP 酶活力的影响顺序为 $A>B>D>C$, 即破碎时间对酶活力影响最大, 其余依次为破碎功率、提取液 pH、料液比。提取 LGG Z23 所产碱性磷酸酶活力最高的组合为 $A_2B_3C_1D_2$, 即破碎时间

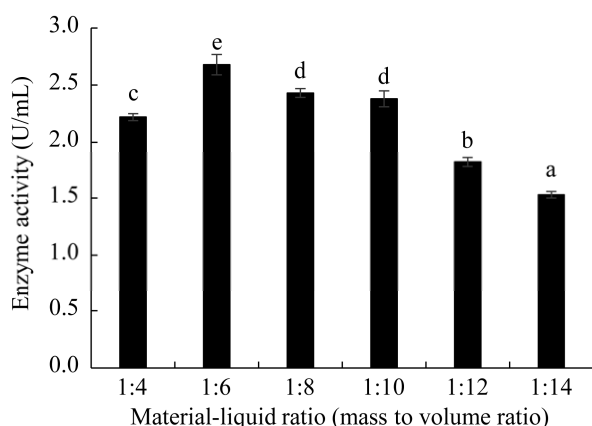


图 3 不同料液比对碱性磷酸酶酶活力的影响
Figure 3 Effect of different material-liquid ratios on the enzyme activity of alkaline phosphatase.

15 min、破碎功率 450 W、料液比 1:4 (质量体积比)、提取液 pH 10.0, 此时酶活力达 (4.86±0.15) U/mL。根据均值分析得出最优组合为 $A_2B_3C_2D_2$, 因此选取这一组合进行验证实验, 测得酶活力为 (4.95±0.26) U/mL, 菌株 Z23 所产 ALP 的最优提取条件确定为: 破碎时间为 15 min, 破碎功率为 450 W, 料液比为 1:6 (质量体积比), 提取液 pH 值为 10.0, 此条件下酶活力为 (4.95±0.26) U/mL, 比优化前提高 2.11 倍。

2.6 乙酰胆碱酯酶抑制率曲线

由 6 种不同有机磷农药对乙酰胆碱酯酶的抑制率曲线(图 5)可知, 在所选浓度范围内线性关系良好, 各有机磷农药的回归方程式分别为: 敌敌畏: $y=0.2999x+0.4027$, $R^2=0.9931$; 乐果: $y=0.1918x+0.2388$, $R^2=0.9910$; 毒死蜱: $y=0.1117x+0.1328$, $R^2=0.9922$; 敌百虫: $y=0.1201x+0.1786$, $R^2=0.9908$; 甲基对硫磷: $y=0.1432x+0.2032$, $R^2=0.9901$; 马拉硫磷: $y=0.2123x+0.0595$, $R^2=0.9934$, 所有线性相关系数 (R^2) 均大于 0.99, 可用于乙酰胆碱酯酶抑制率的计算。

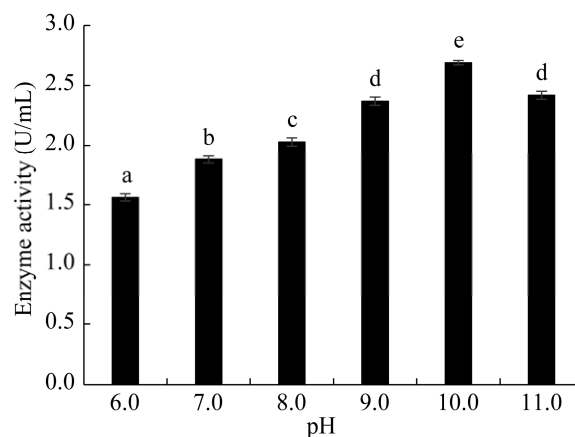


图 4 不同 pH 对碱性磷酸酶酶活力的影响
Figure 4 Effect of different pH on the enzyme activity of alkaline phosphatase.

表 2 正交试验结果

Table 2 Orthogonal test results

Test No.	Factor				Enzyme activity (U/mL)
	A: Crushing time (min)	B: Crushing power (W)	C: Material-liquid ratio (mass to volume ratio)	D: pH of extract	
1	1 (10)	1 (350)	1 (1:4)	1 (9.5)	2.82±0.28
2	1	2 (400)	2 (1:6)	2 (10.0)	3.24±0.13
3	1	3 (450)	3 (1:8)	3 (10.5)	3.08±0.34
4	2 (15)	1	2	3	4.03±0.19
5	2	2	3	1	3.75±0.24
6	2	3	1	2	4.86±0.15
7	3 (20)	1	3	2	3.82±0.09
8	3	2	1	3	3.58±0.22
9	3	3	2	1	4.28±0.18
MV1	3.047	3.557	3.753	3.617	
MV2	4.213	3.523	3.850	3.973	
MV3	3.893	4.073	3.550	3.563	
R	1.166	0.550	0.300	0.410	

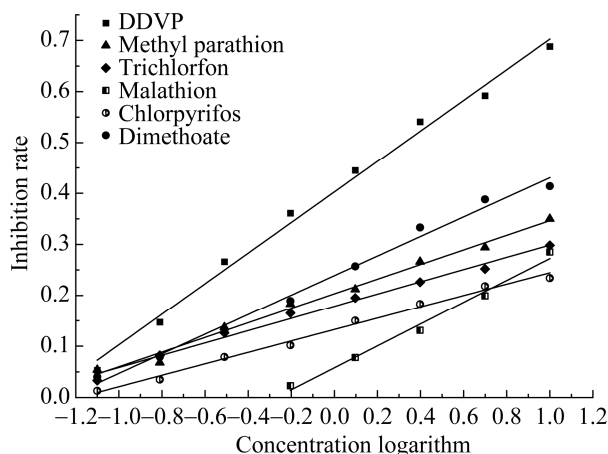


图 5 不同有机磷农药对乙酰胆碱酯酶的抑制曲线

Figure 5 Inhibition curves of AChE by different organophosphorus pesticides.

2.7 ALP 对有机磷农药降解率的测定结果

菌株 Z23 所产 ALP 对不同种类的有机磷农药均有降解作用(表 3), 其中对敌敌畏的降解率为 $95.79\% \pm 0.01\%$, 对敌百虫为 $86.07\% \pm 0.03\%$, 对毒死蜱为 $88.90\% \pm 0.02\%$, 对甲基对硫磷为

$90.69\% \pm 0.03\%$, 对马拉硫磷为 $85.31\% \pm 0.02\%$, 对乐果为 $83.18\% \pm 0.03\%$ 。可见菌株 Z23 所产 ALP 对供试有机磷农药的降解能力依次为: 敌敌畏>甲基对硫磷>毒死蜱>敌百虫>马拉硫磷>乐果。其中对敌敌畏和甲基对硫磷的降解效果最好, 可达 90%以上, 而且降解作用差异显著($P < 0.05$)。

3 讨论与结论

从目前形势来看, 在未来较长时间内, 有机磷农药仍会被大量、广泛使用, 而在其降解途径中, 利用微生物或其产物来降解有机磷农药的方法会很大程度降低产生二次污染的可能, 是消除和降解农药残留的一种安全、高效的方法^[36]。

通过单因素试验和正交试验结果确定, 破碎时间对菌株 Z23 所产碱性磷酸酶活性影响最大, 其次为破碎功率、提取液 pH 及料液比, 郭宇星等的研究结果也表明超声时间是影响氨基酶活性的最显著因素^[37]。此外, 林勤等研究表明单次超声时间是影响超声提取效率的最主要因

表3 ALP对不同浓度有机磷农药的降解作用

Table 3 Degradation of organophosphorus pesticides by ALP at different concentrations

Pesticide types	Concentration of organophosphorus pesticides at different times ($\mu\text{g/mL}$)				
	0 h	2 h	4 h	6 h	8 h
DDVP	1.250	0.963 \pm 0.012d	0.535 \pm 0.037c	0.328 \pm 0.026b	0.062 \pm 0.019a
	2.500	1.726 \pm 0.054d	1.084 \pm 0.032c	0.626 \pm 0.085b	0.107 \pm 0.040a
	5.000	3.483 \pm 0.022d	2.356 \pm 0.067c	1.446 \pm 0.029b	0.169 \pm 0.051a
Trichlorfon	1.250	0.821 \pm 0.038d	0.604 \pm 0.053c	0.355 \pm 0.025b	0.120 \pm 0.033a
	2.500	1.828 \pm 0.014d	1.386 \pm 0.023c	1.072 \pm 0.034b	0.374 \pm 0.019a
	5.000	3.766 \pm 0.031d	2.469 \pm 0.024c	1.603 \pm 0.052b	0.862 \pm 0.066a
Chlorpyrifos	1.250	0.946 \pm 0.016d	0.788 \pm 0.014c	0.523 \pm 0.035b	0.174 \pm 0.042a
	2.500	1.857 \pm 0.011d	1.243 \pm 0.033c	0.757 \pm 0.028b	0.268 \pm 0.015a
	5.000	3.331 \pm 0.072d	2.526 \pm 0.025c	1.401 \pm 0.042b	0.433 \pm 0.058a
Methyl parathion	1.250	0.946 \pm 0.064d	0.788 \pm 0.044c	0.523 \pm 0.039b	0.118 \pm 0.048a
	2.500	1.008 \pm 0.005d	0.764 \pm 0.023c	0.396 \pm 0.016b	0.152 \pm 0.009a
	5.000	1.802 \pm 0.038d	1.334 \pm 0.065c	0.708 \pm 0.029b	0.621 \pm 0.055a
Malathion	1.250	3.379 \pm 0.084d	2.238 \pm 0.058c	1.985 \pm 0.047b	0.196 \pm 0.073a
	2.500	0.896 \pm 0.006d	0.578 \pm 0.011c	0.322 \pm 0.033b	0.409 \pm 0.030a
	5.000	1.786 \pm 0.025d	1.295 \pm 0.054c	0.934 \pm 0.071b	0.601 \pm 0.052a
Dimethoate	1.250	3.893 \pm 0.005d	2.690 \pm 0.025c	1.626 \pm 0.029b	0.259 \pm 0.031a
	2.500	0.919 \pm 0.002d	0.664 \pm 0.042c	0.433 \pm 0.017b	0.379 \pm 0.060a
	5.000	1.897 \pm 0.028d	1.393 \pm 0.045c	0.827 \pm 0.030b	0.729 \pm 0.024a

注：不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)

Note: Different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$).

素^[38]。当破碎时间及功率不足时无法完全破碎细菌细胞壁^[39]，不利于碱性磷酸酶的释放；当破碎时间及功率到达一定值以后，碱性磷酸酶完全释放，持续破碎产生的热量会使酶活性降低，同时还会产生其他杂蛋白，增加提纯难度。因此，本文确定菌株 Z23 细胞的破碎时间为 15 min。

高慢慢等的研究表明，有机磷水解酶对敌敌畏与甲基对硫磷降解率高达 90%以上，但对敌百虫的降解率仅为 28.10% \pm 2.20%^[33]，而 LGG Z23 所产 ALP 对敌百虫的降解率为 86.07% \pm 0.03%。解顺昌研究结果表明，*T. flavus* JMUPM D-3 的甲基对硫磷降解酶粗酶液对乐果和马拉硫磷无降解作用，但对敌敌畏的降解率为 50.3%^[36]，而 LGG Z23 所产 ALP 对马拉硫磷的降解率为 85.31% \pm 0.02%，这些差距是酶的纯化

程度(或酶的浓度)所致。解秀平等研究表明，节杆菌 L4 对甲基对硫磷的降解率较高(85%)，但对毒死蜱的降解率仅为 34%^[40]，而 LGG Z23 所产 ALP 对毒死蜱的降解率为 88.90% \pm 0.02%。江玉姬等分离出的菌株 JS018 对甲基对硫磷的降解率高于 96%，对辛硫磷的降解率高达 99%，但对敌敌畏的降解率为 69%，达不到高效，而且对毒死蜱的降解率极低，只有 17.3%^[41]，而 LGG Z23 所产 ALP 对敌敌畏的降解率为 95.79% \pm 0.01%。因此，尽管目前已筛选出多种微生物与其酶对有机磷农药有降解作用，但大部分都具有单一高效性，而 LGG Z23 所产 ALP 对多种有机磷农药都具有积极的降解作用，这为今后的深入研究和实际应用提供了很好的依据。

综上所述，LGG Z23 所产 ALP 的最优提取

条件确定为: 破碎时间 15 min, 破碎功率 450 W, 料液比 1:6 (质量体积比), 提取液 pH 值 10.0, 此提取条件下酶活力可达(4.95±0.26) U/mL, 比优化前提高 2.11 倍。而且, LGG Z23 所产 ALP 对 6 种有机磷农药的降解率均达到 80%以上, 其中对敌敌畏与甲基对硫磷的降解效果最好, 降解率均高于 90%。本研究结果为 LGG Z23 所产 ALP 的应用研究提供了理论依据和实验数据。

REFERENCES

- [1] 金于涛. UV/Fenton 试剂处理有机磷农药废水实验研究[D]. 西安: 西安科技大学硕士学位论文, 2010
Jin YT. UV/Fenton reagent processing organophosphorus agricultural chemicals wastewater experimental study[D]. Xi'an: Master's Thesis of Xi'an University of Science and Technology, 2010 (in Chinese)
- [2] 黄东, 谢春生, 操江飞, 韦寿莲. 分散固相萃取-气相色谱法测定蔬菜中 7 种有机磷农药残留[J]. 化学工程师, 2021, 35(11): 23-27
Huang D, Xie CS, Cao JF, Wei SL. Determination of 7 organophosphorus pesticide residues in vegetables by SPE-GC[J]. Chemical Engineer, 2021, 35(11): 23-27 (in Chinese)
- [3] Xin LJ. Chemical fertilizer rate, use efficiency and reduction of cereal crops in China, 1998–2018[J]. Journal of Geographical Sciences, 2022, 32(1): 65-78
- [4] 焦美娟, 林文星, 马鹏生, 王芳, 何娜, 吴秀丽. 农药残留生物降解剂的研究进展[J]. 北方园艺, 2021(13): 141-147
Jiao MJ, Lin WX, Ma PS, Wang F, He N, Wu XL. Research progress of pesticide residue biodegradation agents[J]. Northern Horticulture, 2021(13): 141-147 (in Chinese)
- [5] Yang KJ, Lee J, Park HL. Organophosphate pesticide exposure and breast cancer risk: a rapid review of human, animal, and cell-based studies[J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2020, 17(14): 5030
- [6] Schnegelberger RD, Lang AL, Arteel GE, Beier JI. Environmental toxicant-induced maladaptive mitochondrial changes: a potential unifying mechanism in fatty liver disease[J]. Acta Pharmaceutica Sinica B, 2021, 11(12): 3756-3767
- [7] 孟迪. *Bacillus amyloliquefaciens* YP6 在降解有机磷农药中的作用及机理[D]. 无锡: 江南大学博士学位论文, 2020
Meng D. The role and mechanism of *Bacillus amyloliquefaciens* YP6 in the degradation of organophosphorus pesticides[D]. Wuxi: Doctoral Dissertation of Jiangnan University, 2020
- [8] Boedeker W, Watts M, Clausing P, Marquez E. The global distribution of acute unintentional pesticide poisoning: estimations based on a systematic review[J]. BMC Public Health, 2020, 20: 1875
- [9] 何小玲, 聂艳, 王念, 夏华南, 刘嘉宇, 卢雨萱, 贺美. 有机磷农药污染现状与防治对策[J]. 环境生态学, 2021, 3(10): 38-43
He XL, Nie Y, Wang N, Xia HN, Liu JY, Lu YX, He M. The Current situation of organophosphorus pesticides pollution and its countermeasures[J]. Environmental Ecology, 2021, 3(10): 38-43 (in Chinese)
- [10] Deng JC, Li XM, Xiao XL, Wu HJ, Yang CQ, Long XY, Zhang QH, IQBAL N, Wang XC, Yong TW, et al. Field mold stress induced catabolism of storage reserves in soybean seed and the resulting deterioration of seed quality in the field[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2022, 21(2): 336-350
- [11] 刘一帆. 有机磷农药的微生物降解技术[J]. 化工管理, 2021(26): 37-38
Liu YF. The microbial degradation technology of the organophosphorus pesticide[J]. Chemical Enterprise Management, 2021(26): 37-38 (in Chinese)
- [12] 尹芳, 张无敌, 周胖, 张振, 周双双, 赵兴玲, 王昌梅, 柳静, 毛羽, 杨红, 等. 新型生物农药残留降解剂研发及其潜在前景展望[J]. 灾害学, 2016, 31(3): 157-159, 169
Yin F, Zhang WD, Zhou X, Zhang Z, Zhou SS, Zhao XL, Wang CM, Liu J, Mao Y, Yang H, et al. Experiment research and market prospect of new pesticide degradation agent[J]. Journal of Catastrophology, 2016, 31(3): 157-159, 169 (in Chinese)
- [13] Cheng WL, Zeng L, Yang X, Huang D, Yu H, Chen W, Cai MM, Zheng LY, Yu ZN, Zhang JB. Preparation and efficacy evaluation of *Paenibacillus polymyxa* KM2501-1 microbial organic fertilizer against root-knot nematodes[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2022, 21(2): 542-551
- [14] Kaur P, Singh K, Singh B. Microplastics in soil: impacts and microbial diversity and degradation[J]. Pedosphere, 2022, 32(1): 49-60
- [15] Misnal MFI, Redzuan N, Zainal MNF, Ahmad N, Raja Ibrahim RK, Agun LD. Cold plasma: a potential alternative for rice grain postharvest treatment

- management in Malaysia[J]. *Rice Science*, 2022, 29(1): 1-15
- [16] Sehrawat A, Sindhu SS, Glick BR. Hydrogen cyanide production by soil bacteria: biological control of pests and promotion of plant growth in sustainable agriculture[J]. *Pedosphere*, 2022, 32(1): 15-38
- [17] Mitra D, Mondal R, Khoshru B, Senapati A, Radha TK, Mahakur B, Uniyal N, Myo EM, Boutaj H, Sierra BEG, et al. Actinobacteria-enhanced plant growth, nutrient acquisition, and crop protection: Advances in soil, plant, and microbial multifactorial interactions[J]. *Pedosphere*, 2022, 32(1): 149-170
- [18] Mohammed DYH. Isolation and characterization of rhizosphere bacteria capable to activate phosphorus in the alkaline soil[D]. Yangzhou: Master's Thesis of Yangzhou University, 2016
- [19] Chen JX, Song BA. Natural nematicidal active compounds: recent research progress and outlook[J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2021, 20(8): 2015-2031
- [20] 丁小星. 碱性磷酸酶与 PIK3R1 在宫颈癌临床应用中的价值评估[D]. 镇江: 江苏大学硕士学位论文, 2018
- Ding XX. Evaluation of the value of alkaline phosphatase and PIK3R1 in the clinical application of cervical cancer[D]. Zhenjiang: Master's Thesis of Jiangsu University, 2018 (in Chinese)
- [21] Goldberg RF, Austen WG Jr, Zhang XB, Munene G, Mostafa G, Biswas S, McCormack M, Eberlin KR, Nguyen JT, Tatlidede HS, et al. Intestinal alkaline phosphatase is a gut mucosal defense factor maintained by enteral nutrition[J]. *PNAS*, 2008, 105(9): 3551-3556
- [22] Horiuchi T, Horiuchi S, Mizuno D. A possible negative feedback phenomenon controlling formation of alkaline phosphomonoesterase in *Escherichia coli*[J]. *Nature*, 1959, 183 (4674): 1529-1530
- [23] Zappa S, Rolland JL, Flament D, Gueguen Y, Boudrant J, Dietrich J. Characterization of a highly thermostable alkaline phosphatase from the euryarchaeon *Pyrococcus abyssi*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(10): 4504-4511
- [24] Kim EE, Wyckoff HW. Reaction mechanism of alkaline phosphatase based on crystal structures: two-metal ion catalysis[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1991, 218(2): 449-464
- [25] 高明春, 李雪萌, 张润祥, 王君伟. 大肠杆菌菌株 ATCC 25922 碱性磷酸酶的原核表达、纯化及其活性研究[J]. *东北农业大学学报*, 2010, 41(8): 48-53
- Gao MC, Li XM, Zhang RX, Wang JW. Study on prokaryotic expression, purification and enzymatic activity of alkaline phosphatase from *Escherichia coli* ATCC 25922[J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2010, 41(8): 48-53 (in Chinese)
- [26] 段晓霞, 格日乐其木格, 其其日力格, 邱崇顺, 芒来, 乌云达来. 产碱性磷酸酶乳杆菌的筛选鉴定、酶的纯化及特性[J]. *微生物学通报*, 2020, 47(6): 1817-1827
- Duan XX, Gerelchimeg, Qiqirilige, Qiu CS, Manglai, Wuyundalai. Screening, identification, purification and characterization of alkaline phosphatase from *Lactobacillus*[J]. *Microbiology China*, 2020, 47(6): 1817-1827 (in Chinese)
- [27] 段晓霞. 产碱性磷酸酶乳杆菌的筛选、酶学性质及降解有机磷作用研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学硕士学位论文, 2020
- Duan XX. Study on screening, enzymatic properties and degradation of organophosphorus by *Lactobacillus* alkaline phosphatase[D]. Hohhot: Master's Thesis of Inner Mongolia Agricultural University, 2020 (in Chinese)
- [28] Yu YX, Zhang Z, Wang YG, Liao MJ, Rong XJ, Li B, Zhang H. Effects of different preservation methods on physicochemical property of marine pathogen *Vibrio anguillarum*[J]. *Journal of Ocean University of China*, 2019, 18(6): 1417-1426
- [29] Noohi N, Papizadeh M, Rohani M, Talebi M, Pourshafie MR. Screening for probiotic characters in lactobacilli isolated from chickens revealed the intra-species diversity of *Lactobacillus brevis*[J]. *Animal Nutrition*, 2021, 7(1): 119-126
- [30] 安璟. 乳酸菌胁迫反应的影响因素及其耐热性的研究[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2019
- An J. Study on the factors affecting the stress reaction of lactic acid bacteria and its thermotolerance[D]. Wuhan: Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2019 (in Chinese)
- [31] Madebo MP, Luo SM, Wang L, Zheng YH, Jin P. Melatonin treatment induces chilling tolerance by regulating the contents of polyamine, γ -aminobutyric acid, and proline in cucumber fruit[J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2021, 20(11): 3060-3074
- [32] 王薇, 邵百琪, 徐伟, 张雪, 曹雯, 吴凡, 谢红瑶. 阿氏芽孢杆菌(*Bacillus aryabhatai*)分离鉴定及其对蔬菜中甲萘威农药降解作用的研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(24): 9452-9460
- Wang W, Shao BQ, Xu W, Zhang X, Cao W, Wu F, Xie HY. Isolation and identification of *Bacillus aryabhatai* and its degradation of carbaryl pesticide in vegetables[J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2021,

- 12(24): 9452-9460 (in Chinese)
- [33] 高煜煜, 白俊岩, 孙磊, 程书梅, 霍书英. 有机磷水解酶对不同有机磷农药降解功效的评价[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(8): 217-220
Gao MM, Bai JY, Sun L, Cheng SM, Huo SY. Evaluation of degradation efficiency of different organophosphorus pesticides by organophosphorus hydrolase[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2019, 47(8): 217-220 (in Chinese)
- [34] 钟树明, 袁东星, 金晓英, 许鹏翔. 植物酶抑制技术用于检测蔬菜中有机磷及氨基甲酸酯类农药残留[J]. 环境化学, 2002, 21(2): 189-193
Zhong SM, Yuan DX, Jin XY, Xu PX. Determination of organophosphorus and carbamate pesticide residues in vegetables using a plant-hydrolyses inhibition technique[J]. Environmental Chemistry, 2002, 21(2): 189-193 (in Chinese)
- [35] 赵妍. 拟除虫菊酯类农药残留快速检测方法的建立[D]. 上海: 上海交通大学硕士学位论文, 2020
Zhao Y. Development of a method for the rapid determination of pyrethroids[D]. Shanghai: Master's Thesis of Shanghai Jiao Tong University, 2020 (in Chinese)
- [36] 解顺昌. 有机磷农药降解菌的分离鉴定及其产酶特性研究[D]. 厦门: 集美大学硕士学位论文, 2011
Xie SC. Isolation, characterization and PM degrading enzyme production of organophosphorus pesticide degrading fungi[D]. Xiamen: Master's Thesis of Jimei University, 2011 (in Chinese)
- [37] 郭宇星, 潘道东. 超声波破碎法提取瑞士乳杆菌氨肽酶条件的优化[J]. 食品科学, 2008, 29(8): 140-144
Guo YX, Pan DD. Optimization of ultrasonic extraction conditions of aminopeptidase from *Lactobacillus helveticus*[J]. Food Science, 2008, 29(8): 140-144 (in Chinese)
- [38] 林勤, 徐文雅, 董斌, 陈艳芬, 赵越. 响应面法优化类球红细菌中辅酶 Q₁₀ 超声提取工艺[J]. 广东药学院学报, 2016, 32(4): 420-424
Lin Q, Xu WY, Dong B, Chen YF, Zhao Y. Optimization of extraction conditions for coenzyme Q₁₀ from *Rhodobacter sphaeroides* by surface response methodology[J]. Journal of Guangdong Pharmaceutical University, 2016, 32(4): 420-424 (in Chinese)
- [39] 黄忠, 汤庆莉, 吴天祥, 朱思洁, 杨祖滔. 超声波提取灰树花菌丝体蛋白工艺优化[J]. 中国酿造, 2016, 35(7): 151-154
Huang Z, Tang QL, Wu TX, Zhu SJ, Yang ZT. Optimization of extraction technology of protein from *Grifola frondosa* mycelium by ultrasonic wave[J]. China Brewing, 2016, 35(7): 151-154 (in Chinese)
- [40] 解秀平, 闫艳春, 刘萍萍, 王圣惠. 降解甲基对硫磷的节杆菌(*Arthrobacter* sp.)L4 菌株的分离和降解特性研究[J]. 环境科学学报, 2006, 26(10): 1637-1642
Xie XP, Yan YC, Liu PP, Wang SH. Isolation, degradation and characterization of methylparathion degradative strain L4[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2006, 26(10): 1637-1642 (in Chinese)
- [41] 江玉姬, 邓优锦, 刘新锐, 谢宝贵, 胡方平, 辛伟. 一株能高效降解几种有机磷农药的菌株 JS018 的鉴定[J]. 微生物学报, 2006, 46(3): 467-470
Jiang YJ, Deng YJ, Liu XR, Xie BG, Hu FP, Xin W. Isolation and identification of a bacterial strain JS018 capable of degrading several kinds of organophosphate pesticides[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2006, 46(3): 467-470 (in Chinese)